

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

Infektiöse Atemwegserkrankungen beim Rind im Winter 1985/86:
Nachweis von Infektionen mit dem bovinen respiratorischen
Synzytial- und dem Parainfluenzavirus Typ 3
mittels Immunfluoreszenz in Nasentupferproben sowie
mittels Antikörper-Titeranstieg im Serum (ELISA)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Regula Gabathuler
Tierärztin
von Fontnas (SG)

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. E. Peterhans, Korreferent

Zürich 1987

Rieker + Partner AG, Glattbrugg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507222_0011

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

Infektiöse Atemwegserkrankungen beim Rind im Winter 1985/86:
Nachweis von Infektionen mit dem bovinen respiratorischen
Synzytial- und dem Parainfluenzavirus Typ 3
mittels Immunfluoreszenz in Nasentupferproben sowie
mittels Antikörper-Titeranstieg im Serum (ELISA)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Regula Gabathuler
Tierärztin
von Fontnas (SG)

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. E. Peterhans, Korreferent

Zürich 1987

Rieker + Partner AG, Glattbrugg

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	3
2.1. Untersuchungsmaterial	3
2.2. Entnahme der Nasentupferproben	4
2.3. Serumgewinnung	4
2.4. Viren	5
2.5. Zellen und Virusvermehrung	5
2.6. Medium	5
2.7. Antigenpräparation	6
2.8. ELISA für den Antikörpernachweis	7
2.9. Antiseren	10
2.10. Indirekte Immunfluoreszenz (IIF) für den Antigennachweis	12
2.10.1. Aufarbeitung der Nasentupferproben	12
2.10.2. IIF-Methode allgemein	12
2.10.3. IIF-Methode speziell	13
2.11. Liste der Abkürzungen	14
3. RESULTATE	15
3.1. Serologischer Nachweis von Virusinfektionen des Respirationstraktes bei Patienten	15
3.1.1. Nachweis des Antikörper-Titeranstiegs gegen das bovine respiratorische Synzytialvirus (BRSV) in Serumpaaren mittels ELISA	15
3.1.2. Nachweis des Antikörper-Titeranstiegs gegen das Parainfluenzavirus Typ 3 (PI-3) in ge- paarten Seren mittels ELISA	16

3.1.3.	Mittels Antikörper-Titeranstieg (ELISA) nachgewiesene Doppelinfektionen mit BRSV und PI-3, bei Einzeltieren und in Beständen	17
3.1.4.	Beurteilung der serologischen Befunde	17
3.2.	Nachweis von BRSV- und PI-3-Infektionen der Atemwege mittels Virusantigennachweis in Nasenepithelzellen	19
3.2.1.	Nachweis von BRSV-Antigen in Nasentupferproben mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF)	21
3.2.2.	Nachweis von PI-3-Antigen in Nasentupferproben mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF)	22
3.2.3.	BRSV- und PI-3-Doppelinfektionen bei Einzeltieren und in Beständen, nachgewiesen mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF)	23
3.2.4.	Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzmethode (IIF) zum Nachweis von Virusinfektionen im Respirationstrakt	23
3.3.	Vergleich der zwei angewendeten Nachweismethoden: Antikörper-Titerverlauf (ELISA) und Virusantigennachweis (IIF)	24
3.3.1.	Vergleich des ELISA und der IIF beim Nachweis einer BRSV-Infektion	24
3.3.2.	Vergleich des ELISA und der IIF beim Nachweis einer PI-3-Infektion	25
4.	DISKUSSION	27
4.1.	Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden zum Nachweis von Virusinfektionen	27
4.1.1.	Bestimmung des Antikörper-Titerverlaufes	27
4.1.2.	Virusantigennachweis	27

4.2.	Diskussion der Resultate	29
4.2.1.	Vergleichbarkeit der mit dem Antigen-(IIF) und mit dem Antikörpernachweis (ELISA) erzielten Ergebnisse	29
4.2.2.	Diskussion der BRSV-Befunde	30
4.2.3.	Diskussion der PI-3-Befunde	31
4.2.4.	Diskussion der Befunde von BRSV- und PI-3- Doppelinfectionen	32
4.3.	Mögliche Therapie- und Immunprophylaxemassnahmen bei viralen Atemwegserkrankungen des Rindes	33
5.	ZUSAMMENFASSUNG	35
6.	LITERATURVERZEICHNIS	36
7.	VERDANKUNGEN	44
8.	LEBENS LAUF	45

1. EINLEITUNG

Vor allem während der kalten Jahreszeit werden beim Rind Ausbrüche von Respirationserkrankungen beobachtet, wobei vorwiegend Jungtiere unter 18 Monaten betroffen sind. Das klinische Bild kann variieren von Rhinitis, Konjunktivitis und Husten bis hin zu schwerster Dyspnoe. Morbidität und Mortalität betragen 75%, resp. 1% (3,42,51), woraus ersichtlich ist, dass Todesfälle nicht selten vorkommen. Der daraus resultierende wirtschaftliche Schaden, zur Hauptsache durch den Gewichtsverlust verursacht, ist bedeutend (3,27,28,51).

Die Aetiologie boviner Respirationsleiden ist komplex und viele Fragen bleiben noch offen, da sowohl infektiöse als auch nichtinfektiöse Faktoren am Krankheitsgeschehen beteiligt sind (3,10,18,28,30,31,34,47,49,51). Die nichtinfektiösen Faktoren (Stall, Klima, Tierhandel u.a.) sind oft nicht beeinflussbar, so dass sich die Bekämpfungsmassnahmen hauptsächlich gegen die infektiösen Agentien, wie Viren und Bakterien, richten. Weil Virusinfektionen vorläufig chemotherapeutisch nicht angegangen werden können, bleibt die Vakzination das Mittel der Wahl. Voraussetzung für die Wirksamkeit einer Impfung ist jedoch, dass die am Infektionsgeschehen beteiligten Erreger bekannt sind.

Weltweit wird das bovine respiratorische Synzytialvirus (BRSV) als ein wichtiger (3,7,18), in den Niederlanden und in Belgien sogar als der bedeutendste Erreger von Atemwegserkrankungen beim Rind bezeichnet (45,47), wogegen die Rolle des bovinen Parainfluenza-3 Virus (PI-3) als aetiologisches Agens noch umstritten ist (30,34,44,49,51).

In der Schweiz wurde das BRSV erstmals 1970 durch Paccaud und Jacquier aus Konjunktival- und Nasenabstrichen isoliert (35). Auf die Rolle, welche BRSV bei der sogenannten "Rinderrippe" spielen könnte, wies Gabathuler später aufgrund von Serokonversionen bei Tieren mit schweren respiratorischen Symptomen hin (14). In der Folge wurde in zwei seroepidemiologischen Studien eine durchschnittliche BRSV-Durchseuchungsrate von 80% in unserem Lande festgestellt (12,27). Nach Linggi und Wyler war bei akuten Respirationsleiden der Rinder in 41% der Fälle eine Beteiligung des BRSV und in 17% eine solche von PI-3 zu beobachten (27).

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren erstens eine Immunfluoreszenzmethode für den direkten BRSV- und PI-3-Nachweis in Nasentupferproben erkrankter Tiere zu etablieren, sowie zweitens die Rolle von BRSV und PI-3 bei akuten, seuchenhaften Atemwegserkrankungen beim Rind während des Winters 1985/86 abzuklären.

Unsere Untersuchungen ergaben, dass in Beständen mit akutem Respirationsleiden BRSV zu 2/3 und PI-3 zu 1/4 am Infektionsgeschehen beteiligt war. In 1/3 der untersuchten Bestände jedoch liess sich bei Tieren, die an einer akuten Atemwegserkrankung litten, weder eine BRSV- noch eine PI-3-Infektion nachweisen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchungsmaterial

In zwei Praxen des Kantons Zürich und einer Praxis im St. Galler Rheintal wurden im Winter 1985/86 Nasenabstriche und Serumpaare von insgesamt 322 Rindern aus 77 Beständen entnommen.

In einer Praxis handelte es sich vorwiegend um Mast-, in den anderen zwei Praxen um Aufzuchtbetriebe. Wir wurden durch die Tierärzte benachrichtigt, sobald sie zu Patienten mit Atemwegserkrankungen gerufen wurden und dort aufgrund der hervorstechendsten Symptome wie Nasenausfluss, Apathie, Inappetenz und Dyspnoe, ein akutes, ansteckendes Respirationsleiden diagnostizierten. Praktisch alle Patienten wiesen auch eine stark erhöhte Rektaltemperatur von 40°-41°C auf (3,7,27,51).

In den Mästereien erkrankten Tiere aller Altersklassen, d.h. von 14 Tagen bis 18 Monaten. In den Aufzuchtbetrieben handelte es sich bei den Patienten vorwiegend um Jungtiere unter 18 Monaten, und nur in wenigen Beständen waren auch Kühe betroffen.

Im Einverständnis der Tierbesitzer wurde am selben oder folgenden Tag je eine Nasentupfer- und eine Blutprobe (Akutserum), sowie 3-4 Wochen später eine zweite Blutprobe (Rekonvaleszenzserum) entnommen. Dies geschah nicht nur bei erkrankten, sondern auch bei klinisch gesunden Nachbartieren, weil ein Virusnachweis praktisch nur am Ende der Inkubationszeit und während der frühen Krankheitsphase erfolgreich verläuft und schon ca. 7 Tage nach klinischer Manifestation der Erkrankung unwahrscheinlich wird (16).

In 7 Mastbeständen und in 1 Aufzuchtbetrieb waren die Tiere vakziniert. Die Aufzuchtkälber waren mit Rispoval RS^R (Dr. E. Graeub AG, Bern; mind. 10^{5.7} TCID₅₀ BRSV/Dosis) und die Masttiere entweder mit Pneumovac Plus^R (Biokema SA, Crissier; PI-3, Adeno-3, Reo 1, BVD), Imuresp P^R (Dr. E. Graeub AG, Bern; mind. 10^{5.2} GKID₅₀ PI-3/Dosis) oder Rispoval RS^R geimpft worden. In den restlichen 68 Beständen wurde im Herbst nicht gegen Respirationskrankheiten geimpft.

2.2. Entnahme der Nasentupferproben

Die Probeentnahme aus der Nase erfolgte mit 16 cm langen, sterilverpackten Wattetupfern (IVF, Schaffhausen, Schweiz). Man führte den Tupfer soweit als möglich in eine Nasenöffnung ein und zog ihn - gegen das Nasenhöhlendach drückend - wieder heraus. Dann wurde der Tupfer im Transportmedium ausgequirlt und zuletzt an der Röhrchenwand ausgepresst, um möglichst viele Zellen zu gewinnen. Als Transportmedium diente Erhaltungsmedium (s. 2.6.), welches steril in 15 ml-Polystyrolröhrchen (Falcon, Oxnard, CA, USA) abgefüllt wurde. Für die Erhaltung der Zellstruktur ist es wichtig, dass das Transportmedium bis zur Ankunft im Labor gekühlt (ca. 4°C) bleibt.

2.3. Serumgewinnung

Die Blutproben (Röhrchen Nr. 26.323, Sarstedt, Sevelen, Schweiz) wurden über Nacht im Kühlschrank (4°C) gelagert und am nächsten Morgen bei 2'000 rpm (560 g) 10 Min. zentrifugiert. Die gewonnenen Seren wurden in Polystyrolröhrchen (ebenfalls Sarstedt) dekantiert und bei -20°C gelagert.

2.4. Viren

Wir verwendeten Stamm VR-855 Iowa (FS1-1) (ATCC, Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA) des bovinen respiratorischen Synzytialvirus (BRSV) und Stamm VR-739 (ebenfalls ATCC) des bovinen Parainfluenza-3 Virus (PI-3), wie bei Linggi und Wyler beschrieben (27).

2.5. Zellen und Virusvermehrung

Zur Produktion von anti-PI-3-Serum im Kaninchen (s. 2.9.) wurde das PI-3-Virus in VERO-Zellkulturen, sonst ebenso wie BRSV in MDBK-Zellkulturen vermehrt (27). Zur Ueberprüfung der verschiedenen anti-PI-3-Hyperimmunseren wurden foetale Kälber-Nasenepithelzellen (FKNEZ) verwendet (38).

2.6. Medium

Als Nährmedium für alle Zellen diente Eagle's Minimal Essential Medium (E'MEM, Amimed, Basel, Schweiz) mit folgenden Zusätzen: 100 IE/ml Penicillin Novo und 100 µg/ml Streptomycin Novo (Novo Industri A/S, Kopenhagen, Dänemark) und foetales Kälberserum (FCS) (Nabi, Florida, USA). Die Konzentration von FCS betrug im Wachstumsmedium 10%, im Erhaltungsmedium 2%. Allein bei der PI-3-Vermehrung zur Produktion von Hyperimmunserum wurde FCS-freies Medium verwendet.

2.7. Antigenpräparation

Herstellung von BRSV- und PI-3-Antigen für den ELISA:

Es wurden MDBK-Zellen (80% Konfluenz) in fünf 150 cm²-Flasks (Corning Glass Works, Corning, N.J., USA) mit je 1 ml Virussuspension (10^3 TCID₅₀/ml) beimpft und bei 37°C inkubiert. Bei einem zytopathischen Effekt von ca. 90% (etwa nach 9 Tagen Bebrütung) wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und bei 3'800 g 15 Min. zentrifugiert (Ueberstand-A, Pellet-A).

Der Ueberstand-A wurde bei 4°C gelagert. Das Pellet-A verteilte man mit je 10 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) auf die 5 Flasks mit dem MDBK-Zellrasen, löste mit dem Magnetrührstab die Zellen von der Unterlage ab und zentrifugierte die erhaltene Suspension 15 Min. bei 3'800 g (Ueberstand-B, Pellet-B).

Der Ueberstand-B wurde im Kühlschrank gelagert. Das Pellet-B wurde mit 2 ml bidest. Wasser versetzt und dann 30 Min. bei 4°C stehen gelassen. Nach Zugabe von 2 ml doppelt konzentriertem PBS wurde das Pellet-B in einem Dounce-Homogenisator (Bellco, Vineland, N.J., USA) homogenisiert (7 Stösse). Dieses Homogenisat wurde in 10 ml PBS aufgenommen und bei 3'800 g 20 Min. zentrifugiert (Ueberstand-C, Pellet-C).

Anschliessend wurde das Pellet-C bei 4°C aufbewahrt, die Ueberstände A, B, C gepoolt und bei 17'000 rpm (5'211 g) [Sorvall^R Ultrazentrifuge OTD 50B (Du Pont Instruments, Newton, Connecticut, USA) mit Rotor SW27 (Beckman Instruments, Inc., California, USA)] während 90 Min. zentrifugiert (Ueberstände-D, Pellets-D).

Nach dem Verwerfen der Ueberstände-D wurden die Pellets-D in je 5 ml PBS einige Stunden bei 4°C stehen gelassen, danach in Mikropipettenröhrchen (Treff AG, Degersheim, Schweiz) 15 Min. bei 13'000 rpm (14'926 g) zentrifugiert (Ueberstände-E, Pellets-E) und im Kühlschrank gelagert.

Die Pellets-E wurden mit dem Pellet-C vereinigt und nach kurzer Ultraschallbehandlung bei mittlerer Intensität (Sonifier^R cell disruptor B-30, Skan AG, Basel, Schweiz) 15 Min. bei 13'000 rpm (14'926 g) zentrifugiert (Ueberstände-F, Pellets-F).

Die Ueberstände-F wurden mit dem Ueberstand-E vereinigt und dienten als Antigen für den ELISA. Sie wurden anschliessend auf Mikroelisasplatten (Microelisa^R M129A, Dynatech, Embrach, Schweiz) titriert, dann mit PBS-A vorverdünnt, portioniert und bei -60°C gelagert.

Als Kontrollantigen dienten nichtinfizierte Zellen, welche nach der oben beschriebenen Art aufgearbeitet wurden.

2.8. ELISA für den Antikörpernachweis

Das Vorgehen war für den BRSV- und den PI-3-Antikörpernachweis das gleiche.

Mikroelisasplatten mit flachen Dellen (Microelisa^R M129A, Dynatech, Embrach, Schweiz) wurden so gecoatet, dass die Reihen A, C, E, G je 200 µl Kontrollantigen (nichtinfizierte Zellkultur), die restlichen Reihen Virusantigen (Herstellung s. 2.7.) enthielten. Die Adsorption an die Delleninnenwand erfolgte über Nacht bei 4°C in einem Coating-Buffer (1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃, ad 1'000 ml Aqua bidest.; pH 9,6). Die Platten wurden 2x mit PBS-Tween (8,0 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄,

2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KCl, 0,5 ml Tween 20 (Dr. Bender und Dr. Hobein AG, Zürich, Schweiz), ad 1'000 ml Aqua dest.) gewaschen. Nach Zugabe von je 200 μl pro Delle 0.2% bovinem Serumalbumin (BSA) (Fluka, Buchs, Schweiz) in Coating-Buffer wurden die Platten eine Stunde bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert und anschliessend 2x mit PBS-Tween gewaschen.

Für die Austitration der Seren wurden je 200 μl PBS-Tween in alle Dellen 2 - 12 vorgelegt. Die Patientenserum wurden 1:40 mit PBS-Tween vorverdünnt und je 400 μl so eingefüllt, dass die Dellen 1 A, B das Akut- und die Dellen 1 C, D das Rekonvaleszenzserum desselben Patienten enthielten. Entsprechend wurde mit den Dellen 1 E-H verfahren, so dass pro Elisaplatte 2 Serumpaare untersucht werden konnten. Anschliessend wurden die Seren mit einer 8-Kanal-Pipette (Dynatech, Embrach, Schweiz) in 2-er Stufen bis zur 12. Delle verdünnt, was eine Endverdünnung von 1:81'920 ergab. Bei jeder fünften Elisaplatte wurden je 200 μl negatives und positives Kontrollserum, ebenfalls 1:40 mit PBS-Tween verdünnt, in die Dellen 12 A-D, resp. 12 E-H eingefüllt. Die Inkubation der Seren erfolgte bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer und im Dunkeln während einer Stunde, danach wurden die Platten 2x mit PBS-Tween gewaschen.

Als Konjugat wurde RAB-IgG-PO (Rabbit-Anti-Bovine-Immunglobulin G-Peroxidase) (Labor Dr. W. Bommeli, Bern, Schweiz) in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-Tween verwendet, und zwar je 200 μl pro Delle. Inkubation und Waschvorgang erfolgten wie bei den Seren beschrieben. Danach wurden pro Delle 200 μl Substrat-Indikator-Lösung [240 ml 0,1 M NaAcetat, 760 ml 0,1 M Essigsäure, 6,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,1 g ABTS (Boehringer, Mannheim, BRD),

und unmittelbar vor Gebrauch 10 ml 250 mM H_2O_2] zugefügt und nach einstündiger Inkubation der Antikörpertiter von Auge bestimmt. Als Titer galt der reziproke Wert der letzten Verdünnungsstufe, bei welcher noch ein Farbintensitätsunterschied zum Kontrollantigen festgestellt werden konnte.

Aufgrund des ELISA bezeichnete man ein Tier als aktuell infiziert, sofern es einen mindestens 4-fachen Antikörper-Titeranstieg aufwies. Ein Bestand wurde als infiziert betrachtet, wenn sich mindestens ein infiziertes Tier fand.

Die Extinktionswerte wurden auch photometrisch (Titertek^R, Multiskan, Flow Laboratories, Baar, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt und gegen Luft objektiviert. Von jedem Serum wurde die Nettoextinktion ($NE = E_{\text{Virus-AG}} - E_{\text{Kontroll-AG}}$) und nachfolgend die Nettoextinktionsdifferenz (ΔNE) von jedem Serumpaars ($\Delta NE = \Delta NE_{\text{Rekonvaleszent}} - \Delta NE_{\text{Akut}}$) berechnet. Es wurde versucht mathematisch eine Korrelation zwischen ΔNE und dem Titerunterschied (ΔT) aufzustellen, sodass aufgrund der ΔNE bei einer bestimmten Serumverdünnung der ΔT hätte berechnet werden können. Es gelang jedoch nicht, eine Korrelation zwischen ΔNE und ΔT herzuleiten.

Die Ueberprüfung der Spezifität der angewendeten serologischen Testverfahren erfolgte anhand von 100 willkürlich aus der IBR-Diagnostik ausgewählten Seren. Die Spezifität des BRSV-ELISA wurde mittels Serumneutralisations- (SNT) (27) und indirektem Immunfluoreszenztest (IIF) (48) abgeklärt. Dabei stimmten die BRSV-ELISA-Resultate in 92 Fällen (92%) mit dem IIF und in 86 Fällen (86%) mit dem SNT überein. Beim PI-3-ELISA wurde die Spezifität mittels Hämagglutinationshemmtest (HHT)

(50) und mittels SNT überprüft. Es wurde analog vorgegangen wie beim BRSV-SNT, wobei das PI-3-Virus in einer Konzentration von 1'000 TCID₅₀/ml eingesetzt wurde. Eine Uebereinstimmung des PI-3-ELISA mit dem HHT ergab sich in 94 Fällen (94%) und mit dem SNT in 98 Fällen (98%).

2.9. Antiseren

Zum Nachweis von BRSV mittels IIF waren monoklonale Antikörper produziert worden (32). Es wurde ein Pool von 3 monoklonalen Antikörpern ausgewählt, die sowohl im IIF-Test wie auch im ELISA mit BRSV-Antigen reagierten und die unverdünnt in einem Verhältnis von 1:1:1 eingesetzt wurden.

Da bei der IIF für den PI-3-Nachweis die im Handel erhältlichen monospezifischen Antiseren auch nach verschiedenen Absorptionen unspezifisch reagierten, wurde ein Kaninchen-anti-PI-3-Serum (RAPI-3) selber produziert. Dazu immunisierte man ein 2,1 kg schweres Kaninchen mit dem PI-3-Stamm VR-739. Das Antigen wurde wie folgt hergestellt: Eine 150 cm² Corning Gewebekulturflasche mit einem 80% konfluenten VERO-Zellrasen wurde mit 1 ml 1000 TCID₅₀/ml PI-3-Suspension infiziert. Das Erhaltungsmedium war serumfrei. Bei fortgeschrittenem ZPE (3-4 Tage) wurde das Medium dekantiert und 10 Min. bei 3'800 g zentrifugiert. Der so gewonnene Ueberstand wurde bei 52'000 g 90 Min. zentrifugiert [Sorvall^R Ultrazentrifuge OTD 50B (Du Pont Instruments, Newton, Connecticut, USA), Rotor SW27 (Beckman Instruments, Inc., California, USA)]. Die erhaltenen Pellets wurden in je 0,3 ml PBS resuspendiert und anschliessend gepoolt. Für die Grundimmunisierung wurden dem Kaninchen 0,3 ml Antigen

(35 ug Protein/100 µl) und 0,3 ml Freund's komplettes Adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) s.c. appliziert. Für die 1. und 2. Boosterinjektion nach 4, resp. 2 Wochen wurde jeweils dieselbe Menge frisch produziertes Antigen wie zur Grundimmunisierung verwendet, jedoch s.c., i.m. und i.v. verabreicht. 10 Tage nach dem 2. Booster wurde das Kaninchen unter Rompun^R-Ketalar^R-Narkose durch Herzpunktion entblutet, wofür wir 15 ml-Vacutainer^R-Röhrchen (Becton Dickinson, Münchenstein, Schweiz) verwendeten. Das Blut wurde 10 Minuten bei 2'000 rpm (560 g) zentrifugiert und anschliessend das Serum dekantiert. Sowohl vor der Grundimmunisierung wie auch vor den späteren Boosterinjektionen wurde jeweils Blut aus der Ohrvene entnommen und auf Antikörpertiter und Spezifität mittels IIF geprüft. Dieser Test erfolgte auf Objektträgern mit 21 Dellen (bio Mérieux, Charbonnières Les Bains, France), welche man zuvor mit PI-3-infizierten und nichtinfizierten FKNEZ beschichtet, Azeton-fixiert und tiefgefroren hatte. Auf diesen Objektträgern ergab die Verdünnung des RAPI-3-Serums von 1:1'000 (in PBS) eine optimale Spezifität und Intensität der Fluoreszenz.

Um die Eignung des RAPI-3-Serums für den PI-3-Antigennachweis in Nasentupferproben zu prüfen wurde zwei Kälbern (1 resp. 2 Monate alt) eine PI-3-Vakzine (Imuresp P^R) intranasal appliziert und täglich ein Nasenabstrich entnommen. In den so gewonnenen Nasenepithelzellen beider Kälber war am 1. Tag nach der Vakzination PI-3-Antigen mittels IIF nachweisbar.

Die Spezifität der monoklonalen Antikörper gegen BRSV wurde auf bio Mérieux Objektträgern getestet, welche man zuvor mit virusinfizierten und nichtinfizierten MDBK-Zellen beschichtet hatte.

2.10. Indirekte Immunfluoreszenz (IIF) für den Antigennachweis

2.10.1. Aufarbeitung der Nasentupferproben

Die Proben wurden vorerst durch eine doppelte Gazeschicht filtriert und bei 1'200 rpm (340 g) 10 Min. zentrifugiert. Die entstandenen Zellsedimente wurden anschliessend mit PBS so verdünnt, dass die Zellen bei mikroskopischer Betrachtung dicht nebeneinander lagen. Die Endvolumina variierten je nach vorhandener Zellzahl von 0,2 bis 2 ml.

2.10.2. IIF-Methode allgemein

Von den Patientenproben wurden je 9 μ l/Delle auf azetonbeständige Objektträger mit 21 Dellen (bio Mérieux, Charbonnières Les Bains, France) pipettiert, mit dem Fön bei Kaltluft getrocknet und 10 Min. in Azeton (4°C) fixiert. Wenn die Probe nicht weiter verarbeitet werden konnte, wurde sie über Nacht, resp. über das Wochenende bei 4°C gelagert. Auf jede Delle wurden anschliessend 9 μ l virusspezifisches Antiserum gegeben und die Objektträger 30 Min. bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Dann wurden die Objektträger 3 x 10 Min. in einem PBS-Bad (Färbeschalen nach Schiefferdecker, Müller und Krempel, Bülach, Schweiz), anschliessend 5 Min. in bidest. Wasser gewaschen und trockengefönt. Dann wurden die Dellen mit je 9 μ l einer Lösung von virusspezifischen, Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-markierten Antikörpern überschichtet und inkubiert, gewaschen und getrocknet wie oben. Die Montierung der Deckgläser (Müller-Krempel, Bülach, Schweiz) erfolgte mit einem Tropfen PBS-Glycerin

(1:1). Die Präparate wurden danach unter dem "Ortholux II"-Mikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland) nach fluoreszierenden Zellen abgesucht. Als virusinfiziert galt eine Zelle, wenn sie leuchtende, hellgrüne Granula im Zytoplasma aufwies (Abb. 1 und 2, S. 18).

2.10.3. IIF-Methode speziell

Für den BRSV-Nachweis wurde ein Gemisch aus 3 monoklonalen Antikörpern (s.2.9.) und als Konjugat ein FITC-markiertes Kaninchen-Anti-Maus-Serum (RAM-FITC) (Nordic Immunological Lab., Tilburg, Holland), 1:50 verdünnt in PBS, verwendet.

Entsprechend erfolgte der PI-3-Nachweis unter Verwendung eines Kaninchen-Hyperimmunserums (RAPI-3) (s.2.9) in einer Verdünnung von 1:1'000 (in PBS) und eines Schwein-Anti-Kaninchen-Konjugats (SwAR-FITC) (ebenfalls Nordic), 1:50 in PBS verdünnt.

2.11. Liste der Abkürzungen

ABTS:	2.2'-Azino-di-[3-äthyl-benzthiazolinsulfat (6)]
BHV-1:	Bovines Herpesvirus Typ 1
BRSV:	Bovines Respiratorisches Synzytialvirus
BSA:	Bovines Serumalbumin
BVD:	Virus der Bovinen Virusdiarrhoe
EIA:	Enzyme Immuno Assay
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS:	Foetales Kälberserum
FITC:	Fluoreszeinisothiocyanat
FKNEZ:	Foetale Kälber-Nasenepithelzellen
GKID ₅₀ :	Gewebekultur Infektionsdosis 50%
HHT:	Hämagglutinationshemmtest
IIF:	Indirekte Immunfluoreszenz
i.m.:	intramuskulär
i.v.:	intravenös
MDBK:	Madin Darby Bovine Kidney Zellen
NE:	Nettoextinktion
ΔNE:	Nettoextinktionsdifferenz
PBS:	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PI-3:	Parainfluenzavirus Typ 3
RAB-IgG-PO:	Rabbit-Anti-Bovine-Immunglobulin G-Peroxidase
RAM-FITC:	Rabbit-Anti-Mouse-Immunglobulin-FITC
RAPI-3-Serum:	Rabbit-Anti-PI-3-Serum
rpm:	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s.c.:	subcutan
SNT:	Serumneutralisationstest
SWAR-FITC:	Swine-Anti-Rabbit-Immunglobulin-FITC
ΔT:	Titerunterschied
TCID ₅₀ :	Tissue culture infectious dose 50%
Vero-Zellen:	African Green Monkey Kidney-Zellen
ZPE:	Zytopathischer Effekt

3. RESULTATE

3.1. Serologischer Nachweis von Virusinfektionen des Respirationstrakts bei Patienten

3.1.1. Nachweis des Antikörper-Titeranstiegs gegen das bovine respiratorische Synzytialvirus (BRSV) in Serumpaaren mittels ELISA

Insgesamt wurden 322 Tiere aus Betrieben mit akuten Respirationsleiden untersucht. Bei 163 Tieren (50%) war ein signifikanter (mindestens 4-facher) Antikörper-Titeranstieg gegen BRSV zu verzeichnen. Bei 159 Tieren liess sich kein Titeranstieg nachweisen, was jedoch nicht in allen Fällen mit "nichtinfiziert" gleichzusetzen ist (s. Diskussion). Ein Viertel (40) dieser 159 Tiere wies keine Antikörper, der Rest konstante oder fallende Titerwerte auf. BRSV-Antikörper wurden somit bei 282 Tieren (88%) festgestellt. Die Median- und Extremwerte der BRSV-Antikörpertiter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Median- (M) und Extremwerte (E) der Antikörpertiter gegen BRSV im ELISA bei 322 untersuchten Tieren.

	159 Tiere ohne signifikanten BRSV-Titeranstieg		163 Tiere mit signifikantem BRSV-Titeranstieg	
	Akut-Phase	Rekonvaleszenz	Akut-Phase	Rekonvaleszenz
<u>M:</u>	1:2'173	1:1'321	1:628	1:12'849
<u>E:</u>	1:40 bis 1:81'920	1:40 bis 1:40'960	1:40 bis 1:10'240	1:160 bis 1:81'920

Es zeigte sich, dass bei den Seren mit mindestens 4-fachem Titeranstieg in der Rekonvaleszenz der deutlich höchste Medianwert festzustellen war, er betrug das Zehnfache des durchschnittlichen Titors von den Tieren ohne Titeranstieg gegen BRSV. Die Tabelle zeigt aber auch, dass die Diagnose einer aktuellen Erkrankung allein anhand der Titerhöhe unmöglich ist, da bei den Tieren ohne rezente BRSV-Infektion (kein Titeranstieg) ebenfalls Antiköpertiter bis zu 1:81'920 zu beobachten waren. Solche Tiere wiesen Titer mit fallender Tendenz auf. Von den Besitzern wurden jedoch vorher keine Erkrankungen der Atemwege beobachtet.

In 50 von 77 untersuchten Betrieben fand sich mindestens 1 Tier mit einem signifikanten Antikörper-Titeranstieg gegen BRSV (Tab. 3). In ca. 2/3 der Bestände handelte es sich also um ein aktives BRSV-Infektionsgeschehen.

3.1.2. Nachweis des Antikörper-Titeranstiegs gegen das Parainfluenzavirus Typ 3 (PI-3) in gepaarten Seren mittels ELISA

Ein mindestens 4-facher Antikörper-Titeranstieg gegen PI-3 liess sich bei 43 (13%) der 322 untersuchten Tiere nachweisen. Antikörper gegen PI-3 stellte man jedoch in Seren von 294 Rindern fest. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, erreichten die durchschnittlichen Antiköpertiter gegen PI-3 nicht so hohe Werte wie gegen BRSV. Auch der Unterschied zwischen den Titern bei Tieren mit und ohne Titeranstieg war nicht so ausgeprägt wie bei den BRSV-Infektionen. So lag der Medianwert bei den Patienten mit Titeranstieg in der Rekonvaleszenz nur um einen Faktor 3 höher als bei den Tieren ohne Titeranstieg.

Tabelle 2: Median- (M) und Extremwerte (E) der Antikörpertiter gegen PI-3 bei 322 untersuchten Tieren.

	279 Tiere ohne signifikanten PI-3-Titeranstieg		43 Tiere mit signifikantem PI-3-Titeranstieg	
	Akut-Phase	Rekonvaleszenz	Akut-Phase	Rekonvaleszenz
<u>M:</u>	1:1'099	1:754	1:213	1:2'076
<u>E:</u>	1:40 bis 1:10'240	1:40 bis 1:10'240	1:40 bis 1:1'280	1:160 bis 1:10'240

In 1/4 (19) von 77 untersuchten Beständen war mindestens ein Tier mit einer PI-3-Infektion anzutreffen, also etwa dreimal weniger häufig als BRSV-Infektionen (Tab. 3).

3.1.3. Mittels Antikörper-Titeranstieg (ELISA) nachgewiesene Doppelinfektionen mit BRSV und PI-3, bei Einzeltieren und in Beständen

Eine Doppelinfektion liess sich bei 30 von 322 Tieren nachweisen. In 15 der 77 untersuchten Betriebe konnte bei mindestens einem Tier eine Simultaninfektion von BRSV und PI-3 festgestellt werden.

3.1.4. Beurteilung der serologischen Befunde

Bei 176 von 322 untersuchten Rindern aus Beständen mit akuten respiratorischen Problemen fanden wir bei 93% (163 von 176) eine aktuelle BRSV- und bei 24% (43 von 176) eine PI-3-Infektion. Interessanterweise befanden sich unter den 279 Tieren ohne signifikanten Titeranstieg gegen PI-3 nur 10% (28) ohne Antikörper gegen dieses Virus. 90% dieser 279 Patienten wiesen im Akut- und Rekonvaleszenzserum entweder einen konstanten oder einen fallenden Titer auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass PI-3 in diesen Beständen

bereits einmal zirkulierte. Der Titerabfall könnte auf einer abnehmenden Konzentration maternalen Antikörper oder aber auf einer früher durchgemachten Infektion beruhen. Entsprechend dem Vorkommen von Antikörpern gegen BRSV bei 282 und gegen PI-3 bei 294 Rindern ergaben sich Durchseuchungsraten von 88%, bzw. 90%.

Tabelle 3: Häufigkeit des serologischen Nachweises einer BRSV- und PI-3-Infektion mittels ELISA bei 322 Tieren aus 77 Beständen mit akuten Atemwegs-erkrankungen

	BRSV- Infektion	PI-3- Infektion	Doppel- infektion	ohne BRSV- und PI-3-Infektion
Tiere	133 (41%)	13 (4%)	30 (9%)	146 (46%)
Bestände	35	4	15	23

Eine Doppelinfektion mit BRSV und PI-3 war bei 17% aller infizierten (176) Tiere, resp. bei 30 Patienten zu beobachten, wobei sich das klinische Bild nicht von demjenigen bei Monoinfektionen unterschied. Auch der Antikörper-Titerverlauf der Tiere mit einer Doppelinfektion war gleich wie derjenige einfach-infizierter Tiere, und zwar bezüglich BRSV als auch PI-3.

Eine Doppelinfektion von BRSV und PI-3 wurde lediglich in 15 Betrieben festgestellt. Die Befunde zeigten, dass anscheinend in 54 von 77 Beständen mindestens einer dieser zwei Erreger am Infektionsgeschehen beteiligt war. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Verbreitung und mögliche pathogene Rolle insbesondere von BRSV aber auch von PI-3. Andererseits konnten wir in 23 Betrieben weder

BRSV- noch PI-3-Infektionen nachweisen, was vermuten lässt, dass noch andere Viren oder Bakterien sowie Mykoplasmen als primäre Erreger von fieberhaften respiratorischen Erkrankungen beim Rind in Frage kommen.

3.2. Nachweis von BRSV- und PI-3-Infektionen der Atemwege mittels Virusantigennachweis in Nasenepithelzellen

Der serologische Nachweis bedingt die Entnahme von zwei Blutproben im Abstand von ca. 14 Tagen, um einen mindestens 4-fachen Titeranstieg nachzuweisen. Dieses Verfahren hat somit den Nachteil, dass die Diagnose erst vorliegt, wenn das Tier bereits auf dem Wege der Besserung oder schon geheilt ist. Dazu kommt, dass eine erste Blutentnahme in der Frühphase der Krankheit oft unterbleibt, und dass maternale Antikörper nicht selten die Ausbildung einer humoralen Immunantwort verhindern. Daher wurde versucht, in einem schnelleren, direkten Verfahren mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) Virusantigen in Zellen aus Nasentupferproben von Patienten nachzuweisen. Bei den Patienten handelte es sich um die gleichen 322 Tiere, welche auch serologisch untersucht wurden.

Ein Tier galt dann als infiziert, wenn bei mikroskopischer Betrachtung mindestens eine Zelle mit spezifischer Fluoreszenz festgestellt wurde. Diese spezifische Fluoreszenz präsentierte sich sowohl beim BRSV- wie auch beim PI-3-Nachweis folgendermassen (s. Abb. 1 und 2): Apfelgrüne, hell-leuchtende runde Granula unterschiedlicher Grösse (fein-nadelstichartig bis punktförmig) waren über das ganze Zytoplasma verteilt und führten so zu einer charakteristischen Aussparung des Zellkerns. Als typisch ist weiter zu erwähnen, dass sich meist nur vereinzelte Zellen mit spezifischer Fluoreszenz in einer Nasentupferprobe fanden.



Abbildung 1

BRSV-Antigen in einer
Nasenepithelzelle eines
Kalbes mit Dyspnoe, nach-
gewiesen mittels indirekter
Immunfluoreszenz.

Vergrößerung: 1764 x



Abbildung 2

PI-3-Antigen in einer
Nasenepithelzelle eines
Patienten mit respiratorischen
Symptomen, nachgewiesen mittels
indirekter Immunfluoreszenz.

Vergrößerung: 2066 x

Eine ähnliche granulierte Fluoreszenz wurde auch bei Heupollen und Makrophagen beobachtet, wobei die Pollen auffallend intensiv fluoreszierten und bei den Makrophagen die Granula im Zytoplasma grösser als in virusinfizierten Zellen und unregelmässig-fleckig erschienen. In Zweifelsfällen wurde der IIF-Test wiederholt und dabei das Konjugat weggelassen: leuchteten die fraglichen Partikel immer noch, so wurde dies als unspezifische Fluoreszenz angesehen.

3.2.1. Nachweis von BRSV-Antigen in Nasentupferproben
mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF)

Bei 166 (52%) von 322 untersuchten Tieren konnte während der akuten Phase der Krankheit in Nasenepithelzellen BRSV-Antigen festgestellt werden (Tab. 4).

Tabelle 4: BRSV-Antigennachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz in Nasentupferproben von 322 Tieren aus 77 Beständen

	Total untersucht	BRSV-Antigen nachgewiesen in Nasenepithelzellen	BRSV-Antigen nicht nachgewiesen in Nasenepithelzellen
Tiere	322 (100%)	166 (52%)	156 (48%)
Bestände	77	50	27

In 2/3 (50 von 77) der Betriebe fand sich mindestens ein Tier mit einer BRSV-Infektion.

3.2.2. Nachweis von PI-3-Antigen in Nasentupferproben
mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF)

Für die Untersuchung auf PI-3-Antigen standen noch Nasentupferproben von 280 Tieren aus 71 Beständen zur Verfügung, weil die zuerst entnommenen Proben für die Spezifitätsprüfung der im Handel erhältlichen und der selbst hergestellten polyklonalen Anti-PI-3-Seren verwendet wurden. Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, dass PI-3-Antigen nur in 25 (9%) der 280 Nasentupferproben festgestellt wurde. Das PI-3-Virus war also in den untersuchten Beständen zu einem bedeutend geringeren Prozentsatz am Infektionsgeschehen beteiligt als das BRSV.

Tabelle 5: PI-3-Antigennachweis in Nasentupferproben von
280 Tieren aus 71 Betrieben

	Total untersucht	PI-3-Antigen nachgewiesen in Nasenepithel- zellen	PI-3-Antigen nicht nachgewiesen in Nasenepithel- zellen
Tiere	280 (100%)	25 (9%)	255 (91%)
Bestände	71	11	60

Gemäss Tabelle 5 gelang in 11 der 71 Bestände mit akuten Atemwegserkrankungen der Nachweis von PI-3-Antigen bei mindestens einem Tier.

3.2.3. BRSV- und PI-3-Doppelinfektionen bei Einzeltieren und in Beständen, nachgewiesen mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF)

Bei 18 von 280 Tieren liess sich mit dem Virusantigennachweis eine Doppelinfektion mit BRSV und PI-3 feststellen. Diese 18 Tiere stammten aus 3 von 71 Betrieben (Tab. 6). Wie bereits erwähnt, unterschied sich das klinische Bild der Tiere mit einer Doppelinfektion nicht offensichtlich von solchen mit einer BRSV- oder PI-3-Monoinfektion.

3.2.4. Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz-Methode (IIF) zum Nachweis von Virusinfektionen im Respirationstrakt

Gemäss Tabelle 6 erwies sich ein hoher Prozentsatz, nämlich 209 (75%) der 280 auf Virusantigen untersuchten Tiere als BRSV- oder PI-3-infiziert. BRSV kam bei 184 (38%) der 209 infizierten Tiere als aetiologisches Agens in Frage, PI-3 jedoch nur bei 43 (21%) Tieren. Eine BRSV- und PI-3-Doppelinfektion war lediglich bei 18 (9%) aller infizierten Tiere mittels IIF nachzuweisen.

Tabelle 6: Häufigkeit des Nachweises einer BRSV- und PI-3-Infektion mittels IIF bei 280 Tieren aus 71 Betrieben mit akuten Respirationsleiden

	BRSV- Infektion	PI-3- Infektion	Doppel- infektion	ohne BRSV- und PI-3-Infektion
Tiere	150 (59%)	25 (9%)	18 (7%)	71 (25%)
Bestände	50	11	3	2

Von 71 Betrieben, in welchen man auf BRSV- und PI-3-Antigen untersucht hatte, erwiesen sich 69 als infiziert. Eine BRSV-Beteiligung war in 58, eine PI-3-Beteiligung lediglich in 19 Betrieben festzustellen. Somit scheint dem BRSV eine grössere Bedeutung bei akuten Atemwegserkrankungen des Rindes zuzukommen als dem PI-3, zumindest in den von uns in dieser Zeit untersuchten Beständen. Doppelinfektionen mit beiden Viren fanden sich nur in 8 Betrieben.

3.3. Vergleich der zwei angewendeten Nachweismethoden: Antikörper-Titerverlauf (ELISA) und Virusantigennachweis (IIF)

3.3.1. Vergleich des ELISA und der IIF beim Nachweis einer BRSV-Infektion

Mit dem Antigennachweis liess sich bei total 166, mit dem Antikörper-Titeranstieg bei 163 Tieren eine BRSV-Infektion feststellen (Tab. 7). Ein übereinstimmendes Resultat lieferten beide Tests bei 130 Proben mit und bei 111 Proben ohne Nachweis einer aktuellen Infektion. Keine Uebereinstimmung fand sich somit bei 1/4 der untersuchten Tiere. Von diesen 81 Tieren wiesen 12 einen Akuttiter von maximal 1:40, 11 einen Titer von 1:80 und 58 einen Titer von mindestens 1:160 in der ersten Serumprobe auf.

Eine BRSV-Infektion wurde mittels IIF und ELISA übereinstimmend in 45 von 77 untersuchten Betrieben diagnostiziert. In 23 dieser 77 Bestände fanden sich mit beiden Tests keine Anzeichen für eine BRSV-Infektion. Somit erzielten wir in ca. 1/8 (9 von 77) der Bestände mittels IIF und ELISA kein identisches Ergebnis. Der Anteil unterschiedlicher Resultate erwies sich auf Bestandesebene also um die Hälfte kleiner (1/8) als bei den Einzeltieren (1/4).

3.3.2. Vergleich des ELISA und der IIF beim Nachweis einer PI-3-Infektion

Bei 280 untersuchten Tieren wurde in 25 Nasentupferproben aufgrund des Virusantigennachweises und in 39 Serumpaaren anhand des Antikörper-Titeranstiegs eine PI-3-Infektion festgestellt, wobei beide Tests in 18 Fällen identische Ergebnisse lieferten (Tab. 8). Mittels IIF gelang bei 255 und mittels ELISA bei 241 Patienten kein PI-3 Nachweis. Bei diesen nichtinfizierten Tieren stimmten 234 Resultate überein. Somit ergab sich beim Vergleich beider Tests in total 28 (10%) von 280 Fällen ein unterschiedliches Resultat, also ein deutlich geringerer Anteil als die 25% nicht übereinstimmender Ergebnisse bei den BRSV-Infektionen. Von diesen 28 Fällen nicht übereinstimmender Ergebnisse war bei 7 Tieren ein Titer von maximal 1:40, bei 5 Tieren ein Titer von 1:80 und bei den restlichen 16 Tieren ein Titer von mindestens 1:160 in der ersten Serumprobe festzustellen.

Bei 8 von 71 Beständen stimmte das Ergebnis im Falle einer PI-3-Infektion überein, wobei der IIF-Test insgesamt 11, der ELISA 16 Betriebe als aktuell infiziert erkannte (Tab. 8). 60 Betriebe erwiesen sich im IIF-Test, 55 im ELISA als frei von aktuellen PI-3-Infektionen, hier war das mittels beider Methoden erzielte Ergebnis in 52 Betrieben identisch.

Doppelinfektionen von BRSV und PI-3 liessen sich aufgrund von Antigen- und Antikörpernachweis bei einem ähnlichen Prozentsatz feststellen, nämlich bei 7% (18 von 280 Tieren) mittels IIF und bei 9% (30 von 322 Tieren) mittels ELISA.

Tabelle 7: Uebereinstimmung der Resultate beim Nachweis von BRSV-Antigen in Nasenepithelzellen (IIF) und beim Antikörper-Titeranstieg gegen BRSV in Serumpaaren (ELISA).

Resultat	BRSV-Infektion nachgewiesen			BRSV-Infektion nicht nachgewiesen		
	in beiden Tests	nur mittels Virusantigen-nachweis	nur mittels Antikörper-Titeranstieg	in beiden Tests	mittels Virusantigen-nachweis	mittels Antikörper-Titeranstieg
322 Tiere	130	36	33	111	45	48
77 Bestände	45	5	4	23	4	5

Tabelle 8: Uebereinstimmung der Resultate beim Nachweis von PI-3-Antigen in Nasenepithelzellen (IIF) und beim Antikörper-Titeranstieg gegen PI-3 in Serumpaaren (ELISA).

Resultat	PI-3-Infektion nachgewiesen			PI-3-Infektion nicht nachgewiesen		
	in beiden Tests	nur mittels Virusantigen-nachweis	nur mittels Antikörper-Titeranstieg	in beiden Tests	mittels Virusantigen-nachweis	mittels Antikörper-Titeranstieg
280 Tiere	18	7	21	234	21	7
71 Bestände	8	3	8	52	8	3

4. DISKUSSION

4.1. Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden zum Nachweis von Virusinfektionen

4.1.1. Bestimmung des Antikörper-Titerverlaufes

Der ELISA hat sich schon seit längerer Zeit für die Quantifizierung von Antikörpern im Serum etabliert. Bei der vorliegenden Arbeit wurde er als Vergleichsbasis für die neu entwickelte IF-Methode ausgewählt, weil dazu noch kein geeigneterer Test zur Verfügung stand. Der Vorteil der serologischen Methode gegenüber dem Antigennachweis in Nasenepithelzellen liegt darin, dass der Entnahmezeitpunkt nicht so kritisch ist wie beim Nasenabstrich: Der Nachweis eines 4-fachen Antikörper-Titeranstiegs ist auch dann möglich, wenn die erste Blutprobe während der Rekonvaleszenz entnommen wurde. Der Virusnachweis in Nasentupferproben gelingt jedoch nur während maximal einer Woche nach Krankheitsbeginn (16). Ein Nachteil beim serologischen Nachweis aktueller Infektionen ist die Entnahme einer zweiten Blutprobe, da für eine aktuelle Infektion ja nur ein signifikanter Anstieg des Antikörpertiters beweisend ist. Weiter kann die 2. Blutprobe erst nach frühestens 10 Tagen entnommen werden, somit liegt das Resultat für die Einleitung wirkungsvoller Massnahmen am Patienten meist zu spät vor.

4.1.2. Virusantigennachweis

Ein Immunfluoreszenz (IF)-Test zum direkten Virusnachweis im Patientenmaterial wurde erstmals 1968 beschrieben (15). Dieser Test hat sich in der Folge für den Nachweis respiratorischer Viren der herkömmlichen Virusisolation in der Zellkultur als mindestens ebenbürtig erwiesen (8,13, 17,26,29,37,40,46). Eindeutiger Vorteil der IF-Methode ist

die Schnelligkeit des Virusnachweises (ein halber Tag gegenüber 10 Tagen) (13,17). Ein grosser Nachteil der IF-Methode gegenüber der Virusisolation besteht darin, dass nur der vermutete Erreger nachweisbar ist, während in der Zellkultur verschiedene Viren aufgrund ihres zytopathischen Effektes entdeckt werden können (46). Ein weiterer Nachteil der IF-Methode liegt im Zerfall von Zellen während des Transports: Proben sind deshalb direkt nach Entnahme und gekühlt ins Labor zu senden. Ånestad (1) schlägt zur Lösung dieses Problems das Anfertigen von luftgetrockneten Ausstrichen direkt nach Probeentnahme vor. Nach eigener Erfahrung und wie der Literatur zu entnehmen ist (15,17), hat sich dieses Verfahren jedoch nicht bewährt.

Anwendung findet der IF-Test zum Antigennachweis in Nasenepithelzellen während der Virusreplikation und -freisetzung, also während der Inkubation bis maximal 7 Tage nach Krankheitsausbruch (16). Er eignet sich somit vor allem für Bestandesuntersuchungen, da bei Einzeltieren das Resultat nur dann aussagekräftig ist, wenn sich der Patient zum Zeitpunkt der Probeentnahme sicher in der akuten Phase der Krankheit befand.

In den letzten Jahren sind auch Enzym-Immuno-Methoden (Enzyme immuno assay = EIA) und ELISA's zum direkten Virusnachweis in Nasenspülflüssigkeit entwickelt worden (6,11,20,21,36). Für den BRSV-Nachweis existieren bereits käufliche Kits (2,6,25,43). Der Vorteil des EIA und des ELISA gegenüber der Immunfluoreszenz (IF) liegt darin, dass für den Virusnachweis nicht mehr intakte Zellen benötigt werden. Das Probenmaterial kann deshalb ungekühlt eingesandt und direkt für den Test verwendet werden (11,33,36,43). Auch ist beim ELISA und beim EIA eine

Automatisierung möglich, während beim IF-Verfahren eine sorgfältige Betrachtung im Mikroskop nicht zu umgehen ist (6,11,25,36,43). Als Nachteil hat sich beim ELISA und beim EIA die geringere Sensitivität erwiesen (13,43), denn es braucht für einen feststellbaren Farbintensitätsunterschied eine grössere Menge Virusantigen, während mittels IF bereits eine infizierte Zelle entdeckt werden kann.

4.2. Diskussion der Resultate

4.2.1. Vergleichbarkeit der mit dem Antigen-(IIF) und mit dem Antikörpernachweis (ELISA) erzielten Ergebnisse

Auf BRSV-Infektionen wurden Nasentupfer- und gepaarte Serumproben von 322 Tieren aus 77 Beständen mit Erkrankungen des Respirationstraktes untersucht. Bei 81 Tieren (25%), resp. in 9 Betrieben (Tab. 7) erhielt man mit der IIF und dem ELISA nicht übereinstimmende Ergebnisse.

Für den Antigennachweis von PI-3-Infektionen standen Nasentupferproben von 280 Tieren aus 71 Beständen, für die Serologie noch alle 322 gepaarten Blutproben zur Verfügung. Die ELISA- und IIF-Resultate stimmten bei 28 Patienten (10%), resp. in 11 Betrieben nicht überein (Tab. 8).

Der hohe Anteil nicht übereinstimmender Resultate (25% beim BRSV, 10% beim PI-3) scheint auf die Unzuverlässigkeit einer Testmethode hinzudeuten. Verschiedene Autoren (3,24,33,42) weisen jedoch darauf hin, dass sich ein positives IIF- und ein negatives ELISA-Ergebnis, und umgekehrt, nicht widersprechen müssen.

Dafür können verschiedene Gründe aufgeführt werden:
Ein Nachweis von Virus trotz unterbliebenem
Antikörper-Titeranstieg wird vorwiegend bei Jungtieren
unter 3 Monaten beobachtet. Diese weisen oft einen hohen
Titer maternaler Antikörper auf, welcher die Ausbildung
einer humoralen Immunantwort - und somit einen
Titeranstieg im Serum - zu verhindern vermag
(3,4,17,24,26,42,44). Die Hauptursache für ein negatives
IIF-Ergebnis bei serologisch nachgewiesener Infektion
liegt in der kurzen Zeitspanne, während welcher
Virusantigen in Nasenepithelzellen nachweisbar ist,
nämlich nur während der Inkubation und frühen Akutphase.
Da aber bekanntlich die Symptome hinter der
Virusvermehrung "nachhinken", wird der Tierarzt oft erst
zum Patienten gerufen, wenn die Virusreplikation
abgeschlossen ist und bereits Sekundärerreger die Atemwege
besiedelt haben. In dieser Infektionsphase ist ein
Virusnachweis praktisch aussichtslos. Aus diesem Grunde
sollte man Nasentupferproben nicht nur beim erkrankten
Tier entnehmen, sondern zusätzlich bei mindestens 2
Nachbartieren, welche sich in einer früheren
Krankheitsphase befinden könnten.

4.2.2. Diskussion der BRSV-Befunde

Aus der Zusammenstellung der Antikörpertiter von 322
Tieren (Tab.1) ist einerseits zu entnehmen, dass man
anhand nur eines Titerwertes nicht entscheiden kann, ob
der Patient eine aktuelle Infektion durchgemacht hat, da
sich die Extremwerte bei den nichtinfizierten und bei den
infizierten Tieren innerhalb derselben Grenzen bewegen.
Andererseits weisen auch Tiere ohne signifikanten
Titeranstieg hohe Titerwerte auf. Dabei kann es sich um
maternale Antikörper handeln oder um Antikörper, die von
einer kurz vorher durchgemachten Infektion stammen. Ob

passiv oder aktiv erworben, in jedem Fall ist die Präsenz von Antikörpern bei 88% der von uns untersuchten Tiere ein zusätzlicher Hinweis auf die weite Verbreitung des BRSV in der Rinderpopulation, wie sie schon früher für die Schweiz (12, 27) und für andere Länder (3,7,10,22) beschrieben wurde.

Die Rolle des BRSV als Erreger von aktuellen Respirationsleiden in der schweizerischen Rinderpopulation ist sicher gegeben. Dies bestätigen auch Angaben in der Literatur, die auf 30-76%ige BRSV-Infektionsraten (3,10,22,27) hinweisen und die dem Virus eine wirtschaftlich bedeutende Rolle bei bovinen Atemwegserkrankungen zuschreiben (5,7,18,42,45,47). Es darf aber nicht übersehen werden, dass bei 1/3 der betroffenen Bestände weder BRSV noch PI-3 nachzuweisen war (Tab. 3). Dies deutet darauf hin, dass noch weitere infektiöse und/oder nichtinfektiöse Faktoren am Krankheitsgeschehen beteiligt sein müssen.

Auch Wellemans (47) konnte bei 35% der Tiere mit Respirationsleiden weder BHV-1, BRSV, BVD, Adenovirus noch PI-3 nachweisen. Er nimmt an, dass noch unbekannte Erreger von Atemwegserkrankungen existieren.

4.2.3. Diskussion der PI-3-Befunde

Auch PI-3-Infektionen lassen sich aufgrund nur einer serologischen Untersuchung nicht nachweisen (Tab. 2). Das Vorhandensein von PI-3-Antikörpern bei 90% der von uns untersuchten Tiere ist ein Indiz für eine weite Verbreitung des PI-3 in der Rinderpopulation, was die globalen Durchseuchungsraten von 70-90% (4,10,23,39,50) bestätigen. In der Schweiz liegt eine diesbezügliche Angabe von Schipper et al. (41) vor, welche eine Durchseuchungsrate von 56% eruierten.

Wie kann man sich die Präsenz von Antikörpern bei 90% der Tiere ohne beweisenden Titeranstieg gegen PI-3 erklären? Handelt es sich dabei um passiv erworbene (kolostrale) Antikörper gegen PI-3, so haben sie mit dem aktuellen Infektionsgeschehen nichts zu tun. Stehen aber diese Antikörper mit einer früher abgelaufenen Infektion im Zusammenhang, so könnte dies auf eine allgemeine Wegbereiterfunktion des PI-3 für andere virale und bakterielle Infektionen deuten (9,14,34,51). Allerdings spricht gegen eine solche Annahme, dass auch bei intensiver Anwendung von PI-3-Vakzinen kein Rückgang von seuchenhaften Atemwegserkrankungen beim Rind zu erzielen war (30,34).

Der Befund, dass 16% der untersuchten Tiere eine aktuelle PI-3-Infektion aufwiesen (Tab. 8), deckt sich mit früheren Angaben (32,46).

Der geringe Anteil von aktuellen PI-3-Allelinfektionen, die hohe PI-3-Durchseuchungsrate beim Rind und das Fehlen von vorher beobachteten seuchenhaften Atemwegserkrankheiten im Bestand sind Hinweise darauf, dass der PI-3-Allelinfektion keine allzu grosse pathogene Wirkung beizumessen ist, zumindest in den von uns untersuchten Betrieben. Verschiedene Autoren stellen die wirtschaftliche Bedeutung von PI-3-Infektionen im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen beim Rind überhaupt in Frage (4,28,30,34,44,49).

4.2.4. Diskussion der Befunde von BRSV- und PI-3- Doppelinfektionen

Die kleine Zahl von Doppelinfektionen (Tab. 3, 6) spricht dagegen, dass BRSV und PI-3 erst pathogen wirken, wenn es zu einer Simultaninfektion mit beiden Viren kommt.

4.3. Mögliche Therapie- und Immunprophylaxemassnahmen bei viralen Atemwegserkrankungen des Rindes

Therapeutisch kann der Tierarzt bis anhin nur die Sekundärerreger (vorwiegend Bakterien) boviner Respirationsleiden angehen. Dabei können die Therapiekosten für den einzelnen Landwirt zwar beträchtlich sein, gemessen am Gewinnausfall durch den krankheitsbedingten Gewichtsverlust sind sie jedoch als gering einzustufen (3,28,44). In der Humanmedizin wird bereits ein antivirales Chemotherapeutikum (Ribavirin^R) gegen RSV-Infektionen angewendet (19). Die notwendige Aerosol-Dauerapplikation verunmöglicht aber dessen Einsatz in der tierärztlichen Praxis.

Die Immunprophylaxe gegen Atemwegserkrankungen des Rindes hat bisher noch nicht den erhofften Erfolg gebracht. Wahrscheinlich, weil die Applikation meist systemisch und nicht lokal erfolgt, weil maternale Antikörper die Immunantwort hemmen, oder weil die Vakzine selbst ineffiziente Antikörper induziert. Eine weitere Ursache mag darin zu suchen sein, dass die nichtinfektiösen Faktoren (plötzliche Futterumstellung, grosse Temperaturschwankungen, Einstallen von Kälbern verschiedenster Herkunft, Ueberbelegung, u.a.) zu wenig berücksichtigt wurden. Ein Grund für die unbefriedigenden Ergebnisse nach Anwendung verschiedener Vakzinen könnte dadurch bedingt sein, dass in der Schweiz das Spektrum der aetiologisch in Frage kommenden Erreger noch nicht im ganzen Umfang erfasst worden ist. Von einigen Autoren (30,31,49) wird die Wirtschaftlichkeit immunprophylaktischer Massnahmen beim derzeitigen Stand unseres Wissens um dieses komplexe Krankheitsgeschehen prinzipiell in Frage gestellt.

Um die Bedeutung der verschiedenen möglichen viralen Erreger bei Respirationstraktinfektionen des Rindes abzuklären, wäre eine systematische Untersuchung des Patientenmaterials auf Adeno- und BVD-Viren, zusätzlich zu BRSV und PI-3 erforderlich. Hierzu sollte Material von mindestens 2, besser 3 Tieren pro Bestand entnommen werden und zwar nicht nur Nasentupfer-, sondern auch 2 Blutproben zum Nachweis des Antikörper-Titeranstiegs. Dabei sind wie in der vorliegenden Arbeit sowohl Mast- wie auch Zuchtbetriebe in die Untersuchungen einzubeziehen. Es wären auch klinisch unverdächtige Betriebe als "Kontrollen" zu untersuchen, um die pathogene Rolle der oben angeführten Erreger abzuklären.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Winter 85/86 wurden Nasenabstriche und Serumpaare von 322 Rindern aus 77 Beständen mit akuten Atemwegserkrankungen entnommen. Zum Nachweis von Infektionen mit dem bovinen respiratorischen Synzytialvirus (BRSV) und dem Parainfluenzavirus Typ 3 (PI-3) wurden die Nasenabstriche mittels indirekter Immunfluoreszenz auf Virusantigen und die Serumpaare mittels ELISA auf einen signifikanten Antikörper-Titeranstieg hin überprüft.

Die serologischen Untersuchungen haben Durchseuchungsraten von 88% bezüglich BRSV und 90% bezüglich PI-3 ergeben. Eine BRSV-Infektion wurde mittels Nachweis von Virusantigen und/oder Antikörper-Titeranstieg bei insgesamt 199 (62%) Tieren aus 54 von 77 Beständen festgestellt und eine PI-3-Infektion bei 46 (16%) Tieren aus 19 von 71 Beständen. Bei 30 Patienten aus 16 Betrieben trat eine Doppelinfektion mit BRSV und PI-3 auf.

Da die vorliegenden Untersuchungen darauf hinweisen, dass noch andere virale Erreger bei Respirationstrakterkrankungen des Rindes eine Rolle spielen, sollen in einer weiteren Studie auch BVD- und bovine Adenoviren in die Untersuchung miteinbezogen werden.

Die therapeutischen und vor allem immunprophylaktischen Massnahmen werden kurz diskutiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ånestad G.: Surveillance of respiratory viral infections by rapid immunofluorescence diagnosis, with emphasis on the epidemiological development of respiratory syncytial virus infections. J. Hyg. Camb., 94, 349-356, 1985.
2. Bartholoma N., McMillan J., Weiner L., Forbes B.A.: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with immunofluorescence and cell culture for the detection of respiratory syncytial virus in clinical specimens. Abstr. 86th Annual Meeting Amer. Soc. Microbiol. 1986, p. 337.
3. Baker J.C.: Studies on the bovine respiratory syncytial virus. University Microfilms International, Michigan, USA, 1986.
4. Van Bakkum J.G.: Respiratory disease in the bovine caused by viruses. Proc. 12th World Congr. Dis. Cattle, Amsterdam, 1, 16-20, 1982.
5. Bohlender R.E.: Field trials of a bovine respiratory syncytial virus vaccine. Mod. Vet. Pract., 65, 606-609, 1984.
6. Bromberg K., Tannis G., Daidone B., Clarke L., Sierra M.F.: Comparison of ortho respiratory syncytial virus enzyme-linked immunosorbent assay and HEp-2 cell culture. J. Clin. Microbiol., 22, 1071-1072, 1985.
7. Brugère-Picoux J.: Le virus respiratoire syncytial bovin. Une revue. Rec. Méd. vét., 157, 875-882, 1981.

8. Cheeseman S., Pierik L.T., Leombruno D., Spinos K.E., McIntosh K.: Evaluation of a commercially available direct immunofluorescent staining reagent for the detection of respiratory syncytial virus in respiratory secretions. *J. Clin. Microbiol.*, 24, 155-156, 1986.
9. Cho H.J., Jericho K.W.F.: Induction of immunity against pneumonic pasteurellosis following experimental infection in calves. *Can. J. Vet. Res.*, 50, 27-31, 1986.
10. Coudert M., Perrin M., Moussa A., Fedida M., Dannacher G.: Les pneumopathies virales des bovins en France: Situation épidémiologique actuelle. 11th Int. Congr. Dis. Cattle, Tel-Aviv, 1.1, 350-354, 1980.
11. Flanders R.T., Lindsay P.D., Chairez R., Brawner T.A., Kumar M.L., Swenson P.D., Bromberg K.: Evaluation of clinical specimens for the presence of respiratory syncytial virus antigens using an enzyme immunoassay. *J. Med. Virol.*, 19, 1-9, 1986.
12. Florent G., de Marneffe C., Boller E.: Bovines Respiratorisches Syncytial-Virus in der Schweiz: Eine serologische Studie. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 127, 661-663, 1985.
13. Freke A., Stott E.J., Roome A.P.C.H., Caul E.O.: The detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates: Assessment, formulation, and evaluation of monoclonal antibodies as a diagnostic reagent. *J. Med. Virol.*, 18, 181-191, 1986.

14. Gabathuler K.: Respiratorisches Syncytialvirus in der Rinderpraxis. Schweiz. Arch. Tierheilk. 125, 149-153, 1983.
15. Gardner P.S., McQuillin J.: Application of immunofluorescent antibody technique in rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. Brit. Med. J., 3, 340-343, 1968.
16. Gardner P.S., McQuillin J., McGuckin R.: The late detection of respiratory syncytial virus in cells of respiratory tract by immunofluorescence. J. Hyg. Camb., 68, 575-581, 1970.
17. Gardner P.S., McQuillin J.: Preparation of specimens and respiratory syncytial virus, in: Rapid virus diagnosis, application of immunofluorescence, 2nd ed., Butterworths London, 92-97, 110-123, 1980.
18. Gillette K.G., Smith P.C.: Respiratory syncytial virus infection in transported calves. Am. J. Vet. Res., 46, 2596-2600, 1985.
19. Hall C.B., McBride J.T., Gala C.L., Hildreth S.W., Schnabel K.C.: Ribavirin treatment of respiratory syncytial viral infection in infants with underlying cardiopulmonary disease. J. Amer. med. Assn., 254, 3047-3051, 1985.
20. Hendry R.M., Pierik L.T., McIntosh K.: Comparison of washed nasopharyngeal cells and whole nasal secretions for detection of respiratory syncytial virus antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol., 23, 383-384, 1986.

21. Hornsleth A., Friis B., Krasilnikof P.A.: Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by a biotin-avidin ELISA more sensitive than the fluorescent antibody technique. J. Med. Virol., 18, 113-117, 1986.
22. Kahrs R.F.: Respiratory syncytial virus, in: Viral diseases of cattle, Iowa State University Press, 215-220, 1985.
23. Kahrs R.F.: Parainfluenza 3, in: Viral diseases of cattle, Iowa State University Press, 171-181, 1985.
24. Kimmann T.G., Zimmer G.M., Straver P.J., de Leeuw P.W.: Diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections improved by virus detection in lung lavage samples. Am. J. Vet. Res., 47, 143-147, 1986.
25. Lauer B., Masters H.A., Wren C.G., Levin M.J.: Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol., 22, 782-785, 1985.
26. Lenette E.H., Balavs A., Hausler W.J., Shadow H.J.: Parainfluenza and respiratory syncytial viruses, in: Manual of clinical microbiology, 4th ed., Am. Society for Microbiology, Washington, 763-768, 1985.
27. Linggi T., Wyler R.: Das bovine respiratorische Synzytialvirus als Erreger von Respirationstrakterkrankungen des Rindes: Eine klinische und sero-epidemiologische Untersuchung in der Schweiz. Schweiz. Arch. Tierheilk., 127, 651-659, 1985.

28. Mahin L., Wellemans G., Shimi A.: Prevalence of antibodies to bovid herpesvirus 1 (IBR-IPV), bovine virus diarrhoea, bovine respiratory syncytial, parainfluenza 3, adeno A and adeno B viruses in indigenous and imported Moroccan cattle. *Ann. Rech. Vét.*, 16, 279-283, 1985.
29. Mahy B.W.J. (ed.): Pneumoviruses, in: *Virology, a practical approach*, IRL Press, Oxford, 95-117, 1985.
30. Martin S.W.: Vaccine prophylaxis of bovine respiratory disease. *Can. Vet. J.*, 25, 44-48, 1984.
31. Martin S.W., Meek A.H.: A path model of factors influencing morbidity and mortality in Ontario feedlot calves. *Can. J. Vet. Res.*, 50, 15-22, 1986.
32. Metzler A.E., Matile H., Gassmann U., Engels M., Wyler R.: European isolates of bovine herpesvirus 1: A comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.*, 85, 57-69, 1985.
33. Meurman O., Sarkkinen H., Ruuskanen O., Hänninen P., Halonen P.: Diagnosis of respiratory syncytial virus infection in children: Comparison of viral antigen detection and serology. *J. Med. Virol.*, 14, 61-65, 1984.
34. Mohanty S.B.: Vaccination programs against IBR, PI-3 and Pasteurellae. *Proc. 12th World Congr. Dis. Cattle*, Amsterdam, 1, 139-145, 1982.
35. Paccaud M.F., Jacquier C.: A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 30, 327-342, 1970.

36. Popow-Kraupp T., Kern G., Binder C., Tuma W., Kundi M., Kunz C.: Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence and virus isolation: A comparative study. J. Med. Virol., 19, 123-134, 1986.
37. Pothier P., Nicolas J.C., Prudhomme de Saint Maur G., Ghim S., Kazmierczak A., Bricout F.: Monoclonal antibodies against respiratory syncytial virus and their use for rapid detection of virus in nasopharyngeal secretions. J. Clin. Microbiol., 21, 286-287, 1985.
38. Raymann K.: Klassifizierung der Parapoxviren (Stomatitis-, Orf- und Euterpocken-Viren) mit Hilfe der Restriktionsanalyse. Diss. med. vet. Fak. Zürich, 1980.
39. Rolle M., Mayr A.: Parainfluenza-3 Virusinfektion des Rindes, in: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 5. Auflage, Enke-Verlag Stuttgart, 496-498, 1984.
40. Routledge E.G., McQuillin J., Samson A.C.R., Toms G.L.: The development of monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus and their use in diagnosis by indirect immunofluorescence. J. Med. Virol., 15, 305-320, 1985.
41. Schipper E., Nicolet J., König H., Steck F.: Virusbedingte Respirationskrankheiten in Kälber- und Rindermastbetrieben. Schweiz. Arch. Tierheilk., 114, 334-360, 1972.

42. Stott E.J., Taylor G.: Respiratory syncytial virus: Brief review. Arch. Virol., 84, 1-52, 1985.
43. Swenson P.D., Kaplan M.H.: Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by a commercial enzyme immunoassay. J. Clin. Microbiol., 23, 455-488, 1986.
44. Terpestra C., Eikelenboom J.L., Glas C.: Experiences with early vaccination of fattening calves against IBR, BVD and PI-3. Proc. 12th World Congr. Dis. Cattle, Amsterdam, 1, 179-181, 1982.
45. Verhoeff J., Van Nieuwstadt A.P.K.M.I.: Prevention of bovine respiratory syncytial virus infection and clinical disease by vaccination. Vet. Rec., 115, 488-492, 1984.
46. Waner J.L., Whitehurst N.J., Jonas S., Wall L., Shalaby H.: Isolation of viruses from specimens submitted for direct immunofluorescence test for respiratory syncytial virus. J. Pediat., 108, 249-250, 1986.
47. Wellemans G.: Evaluation du programme de vaccination anti-virus respiratoire syncytial bovin en Belgique. Proc. 12th World Congr. Dis. Cattle, Amsterdam, 1, 146-152, 1982.
48. Welliver R.C., Kaul T.N., Putman T.I., Sun M., Riddlesberger K., Ogra P.L.: The antibody response to primary and secondary infection with respiratory syncytial virus: Kinetics of class-specific responses. J. Ped., 96, 808-813, 1980.

49. Wilkie B.N.: Is immunization against bovine respiratory disease possible? Can. Vet. J., 25, 48-50, 1984.
50. Wизigmann G.: Untersuchungen über Epidemiologie und Aetiologie der Rindergrippe. Zbl. Vet. Med. B, 21, 563-579, 1974.
51. Yates W.D.G.: A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can. J. Comp. Med., 46, 225-263, 1982.

7. VERDANKUNGEN

Allen, die mir während dieser Arbeit geholfen haben, möchte ich herzlich danken, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. R. Wyler für die Ueberlassung des Themas und seine stetige Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. E. Peterhans für die Uebernahme des Korreferates.

Mutter und Vater unter anderem für Entnahme und Zustellung von Proben, ebenso Frau und Herrn Dr. Boller in Wald wie auch Herrn Dr. Hess in Effretikon für die freundliche und zuverlässige Ueberweisung der Patienten.

Allen Landwirten für ihr Interesse, aber auch die Zeit und die zum Teil tatkräftige Hilfsbereitschaft, die sie mir zur Verfügung stellten.

Herrn R. Kocherhans, welcher mich sorgfältig in die verschiedenen Labormethoden einführte.

Und Frau J. Diener, ohne ihre Hilfe sässe ich vielleicht jetzt noch an der Schreibmaschine.

8. LEBENS LAUF

Regula Gabathuler, am 21.12.1960 in Fontnas geboren.

Besuch von Primar- und Sekundarschule in Wartau und der Kantonsschule in Sargans.

1980	Matura Typus B
1980 - 1981	Medizinstudium bis zum 1. Propädeutikum an der Universität Fribourg
1981 - 1985	Studium und Staatsexamen an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich
seit November 1985	Assistentin am Institut für Virologie der Universität Zürich (Leitung: Prof. Dr. R. Wyler)

